增殖细胞核抗原蛋白在 *Spodoptera frugiperda* 昆虫细胞中的表达及纯化*

陈军军[1] 娄颖[1] 张元兴[123] 刘琴[123] 刘晓红[12]**
1 华东理工大学 上海 200237； 2 上海海洋动物疫苗工程技术研究中心 上海 200237；
3 上海生物制造技术协同创新中心 上海 200237

摘要 目的：利用昆虫细胞表达系统生产重组的人增殖细胞核抗原（Proliferating cell nuclear antigen, PCNA），并进行纯化和抗体结合特性鉴定。方法：以 HeLa 细胞逆转录的 cDNA 为模板，扩增人 PCNA 基因，并插入杆状病毒载体 AcMNPV。利用昆虫细胞得到 PCNA 基因的重组杆状病毒。病毒感染细胞表达蛋白，联合镍柱亲和层析和离子交换层析获得高纯度的重组人 PCNA 蛋白。ELISA 法测定抗体结合特异性。结果：以 HeLa 细胞 cDNA 为模板得到的基因序列同 GenBank 的人 PCNA 基因序列一致。草地贪夜蛾细胞（Spodoptera frugiperda, Sf9）表达重组人 PCNA（Recombinant human PCNA, rPCNA）的最佳感染值（MOI）和感染时间分别为 0.05 和 144 h。rPCNA 的产量高达 110 mg/L 细胞，纯度> 95%。间接 ELISA 法检测抗体结合特性，rPCNA 的敏感性和特异性分别为 93.3%和 85.0%。结论：建立了 rPCNA 的表达和纯化方法，获得了高效表达、高度抗体结合特异性的 PCNA 蛋白，该蛋白能进一步开发为 PCNA 相关疾病的体外诊断试剂盒，具较大的应用价值。

关键词 增殖细胞核抗原 杆状病毒 昆虫细胞 蛋白纯化 抗体结合特异性

增殖细胞核抗原（PCNA）为哺乳动物 DNA 聚合酶δ的辅助蛋白，PCNA 不仅参与 DNA 合成、修复，细胞周期调控甚至在细胞凋亡中也发挥着重要作用[1]。同时，PCNA 是引发系统性红斑狼疮（SLE）患者产生自身免疫性抗体的抗原物质[2]。PCNA 是体外检测 SLE 的重要疾病标志物之一[3]。

杆状病毒表达载体系统（Baculovirus expression vector system, BEVS）[4]能高效的生产重组杆状病毒，并且已广泛用于不同种类的昆虫细胞表达异源蛋白的实践中[5-7]。该系统有许多优点，如容纳大 DNA 片段插入，恰当的翻译后修饰，高生物安全性等。迄今为止，许多自身免疫性疾病相关的抗原已经通过 BEVS 成功表达，如检测自身免疫性甲状腺疾病的甲状腺过氧化物酶[8]，克罗恩病的酶原颗粒糖蛋白 2 [9]。虽然 PCNA 已在大肠杆菌[10-11]和酿酒酵母[12]中表达，但是经杆状病毒表达系统的生产重组 PCNA 的工艺流程尚未建立。

建立了 Sf9 昆虫细胞表达人 PCNA 蛋白的工艺流程，经两步纯化获得了高纯度和高产量（110 mg/L）的重组 PCNA 蛋白。ELISA 法验证了重组 PCNA 的抗体结合特性，为后续开发体外诊断试剂盒打下了坚实的基础。

第一作者: 陈军军 E-mail: junjunchen2014@163.com
上海市徐汇区梅陇路 130 号华东理工大学，200237
** 通 讯 作 者 : 刘 晓 红 Tel.: +86-21-64253065; Fax: +86-21-64253025;E-mail: liuxiaohong@ecust.edu.cn
上海市徐汇区梅陇路 130 号华东理工大学，200237
*国家自然科学基金（31622059）、中央高校基础研究基金（222201717019）资助项目

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株、质粒 *E.Coli* DH5α，草地贪夜蛾卵巢细胞 Sf9 为本实验室保存，转移载体 pFastBac HT-B 和菌株 *E.Coli* DH10Bac™ 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 试剂与溶液 限制性内切酶购自 NEB 公司；质粒小抽试剂盒，基因纯化回收试剂盒和蛋白 marker 购自天根生物公司；质粒大抽试剂盒(Plasmid Purification Kit)购自 QIAGEN 公司；氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、四环素购自 Inalco 公司；TRIzol 购自 Thermo Fisher 公司；逆转录酶购自 Takara 公司。Sf900™ Ⅱ SFM、澳洲胎牛血清、细胞培养双抗、Cellfectin 转染试剂、病毒滴度检测实验的 1.3x 培养基、低熔点 4%琼脂糖凝胶购自 Invitrogen 公司。Ni Bestarose 6 FF 和 Q Bestarose FF 购自博格隆(上海)生物技术有限公司。咪唑和甘油购自生工生物工程(上海)有限公司。PCNA 自免疾病阳性血清和健康人对照血清由医院捐赠。96 孔酶标板购自康宁公司；HRP-兔抗人 Ig G 购自博士德生物工程有限公司；对照品 PCNA 蛋白购自 Diarect 公司。其他常用药品购自生工生物工程(上海)有限公司或者上海凌峰公司。药品和试剂除特别注明都是分析纯级别。

1.2 构建重组杆状病毒

抽提 HeLa 细胞的总 RNA，逆转录为 cDNA，以 cDNA 为模板，PCNA 基因特异性引物（F：5'-ATGTTCGAGGCGCGCCTGGTCCAG-3'，R：5'-CTAAGATCCTTCTTCATCC-3'）扩增，获得全长的人 PCNA 基因。BamH1 和 Hind Ⅲ限制性内切酶切割 pFastBac HTB 质粒，C 末端 6x 组氨酸标签的 PCNA 基因亚克隆到 pFastBac HTB 载体。pFastBac 标准引物（F：5'-TCCGGATTATTCATACCGTCCC-3'和 R：5'-CCTCTACAAATGTGGTATGGCTG-3'）验证插入部分。重组正确的 pFastBac HTB-rPCNA 质粒钙转到大肠杆菌 DH10Bac 中，经转座制备重组杆状病毒，由 pUC / M13 标准引物（F：5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' 和 R：5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'）经 PCR 和测序验证。重组杆状病毒基因组（AcMNPV-rPCNA）经 Cellfectin II 试剂转染入 Sf9 昆虫细胞，3 天后收集培养基上清液。按感染复数(Multiplicity of infection，MOI) 0.05 进行两轮病毒扩增，获得很高的病毒滴度。噬菌斑法测定滴度值。

1.3 昆虫细胞的生长和维持

Sf9 的培养如参考文献[13]所述。将 Sf9 昆虫细胞接种到含 2.5％胎牛血清的培养基中，悬浮培养，培养温度 27℃，摇床转速 135 rpm。细胞接种时密度 6～8×10^5 个/ml，存活率> 95％，2～3 天后进行细胞计数和传代。计数时，用 PBS 稀释细胞液，再加入台盼蓝染色，显微镜下测定活细胞数目。

1.4 最优 MOI 和感染时间的确定

为确定蛋白表达的最佳参数，将 Sf9 细胞以 1×10^6 细胞/孔接种到 6 孔培养板中。过夜固定，不同孔中加入不同 MOI（0, 0.05, 0.2, 1, 4, 10）的重组杆状病毒 AcMNPV-rPCNA，每天收获一块 6 孔培养板。操作为，将 6 孔板 4℃，1000 g 离心 10 分钟分离上清和细胞，弃去上清，向孔板中加入 1× loading buffer 制样，用 anti-His 一抗 western blot 法检测蛋白的相对含量。

1.5 小规模表达、分离和纯化 rPCNA 蛋白

对数生长期存活率高于 95％的 Sf9 细胞稀释到 1×10^6/ ml，体积 200ml，培养 24 h

后，细胞密度达 1.8～2.4×10^6 个/ ml，按 MOI 0.05 加入 AcMNPV-rPCNA 病毒。感染 6 天，收获 Sf9 细胞，细胞存活率 40～50%。4℃，1000g 离心 10 分钟分离上清液和细胞沉淀，细胞沉淀可储存到-80℃，纯化时再取出。为检测 rPCNA 能否从细胞中抽提和纯化，向 200ml Sf9 细胞离心后的沉淀中加入 50 ml 裂解缓冲液（40 mM 磷酸钠，pH7.4，500 mM 氯化钠，5%（v / v）甘油，1 mM PMSF)，混匀后高压匀浆破碎。破碎液震荡孵育 30 分钟，12000 g 离心 40 分钟，上清液 0.45 μ m PVDF 膜过滤后上 Ni-NTA 亲和色谱柱。所有操作步骤都在 4℃下进行，体系中加 PMSF 蛋白酶抑制剂可最大程度减少重组蛋白的降解。

1.6 大规模表达、分离和纯化 rPCNA 蛋白

使用最优参数在 5 L 发酵罐中进行 rPCNA 大规模表达。匀浆破碎液中的 rPCNA 蛋白经镍柱亲和层析后，离子交换层析（Q sepharose）进一步纯化。离子交换纯化采用稳定 pH 值，氯化钠浓度梯度洗脱的策略。洗脱液中的 rPCNA 经超滤仪器转移到保存液（16 mM HEPES pH 8.0, 400 mM 氯化钠，20%（v / v）甘油）中。Bradford 法测定蛋白浓度，考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白纯度。

1.7 间接 ELISA 法检测血清样品

100 μl 纯化的 rPCNA 蛋白或细菌表达的 PCNA 参考蛋白（命名为 PCNA1，购自 Diarect 公司）以 2 μg/ ml 的终浓度包被孔板，4℃孵育过夜。洗涤孔板后，5%脱脂奶粉封闭 2 小时。PBST 以 100:1 的比例稀释血清样本，每孔中加入 100μl 血清，37℃孵育 1 小时。兔抗人 IgG-辣根过氧化物酶二抗（Jackson，USA）按 1:4000 稀释，每孔加 50μl。1 小时后，加入底物 TMB（每孔 100μl)，孵育 5～10 分钟。2M H_2SO_4（每孔 50 μ l）终止反应，450nm 读板[14]。

作为体外诊断用蛋白，rPCNA 的灵敏度和特异性[15]纳入到检测指标中。灵敏度（%）=（ELISA 阳性样本数/阳性血清数）×100%；特异性（%）=（ELISA 阴性样品数/阴性血清数）×100%。阴性和阳性结果的分界值（cut-off value）定义为阴性对照血清测量平均值两倍的数值[16]。

2 结果与分析

2.1 制备重组杆状病毒

获得的 PCNA 的全长基因与理论序列（GenBank 登录号 NM_002592.2）比对，序列一致（图 1A)，将基因亚克隆到 pFastBac HTB（图 1B）中。重组质粒转移到大肠杆菌 DH10Bac 中经转座获得重组的杆状病毒质粒。转染 Sf9 细胞收获杆状病毒 P1 代，连续感染，收获 P2 和 P3 代病毒。

通常使用 P3 病毒原液侵染昆虫细胞表达生产重组蛋白。经 P3 代病毒感染 3 天后，Sf9 细胞出现裂解，病毒出芽以及从平板上脱落的迹象，而对照组的细胞紧密地粘附在平板底部，保持高密度生长（图 1C)。噬菌斑法测定，rPCNA 的 P3 原液滴度为 2×10^8 pfu / ml。这些结果表明 rPCNA 杆状病毒在 Sf9 细胞中可以有效增殖。为了验证 Sf9 细胞中 rPCNA 的表达，感染 3 天后收获 Sf9 细胞，培养基上清液和细胞沉淀物用 anti-His 一抗 western blot 检测。由图 1D 可见，rPCNA 蛋白主要存在于细胞沉淀，不能有效的分泌到上清液中。

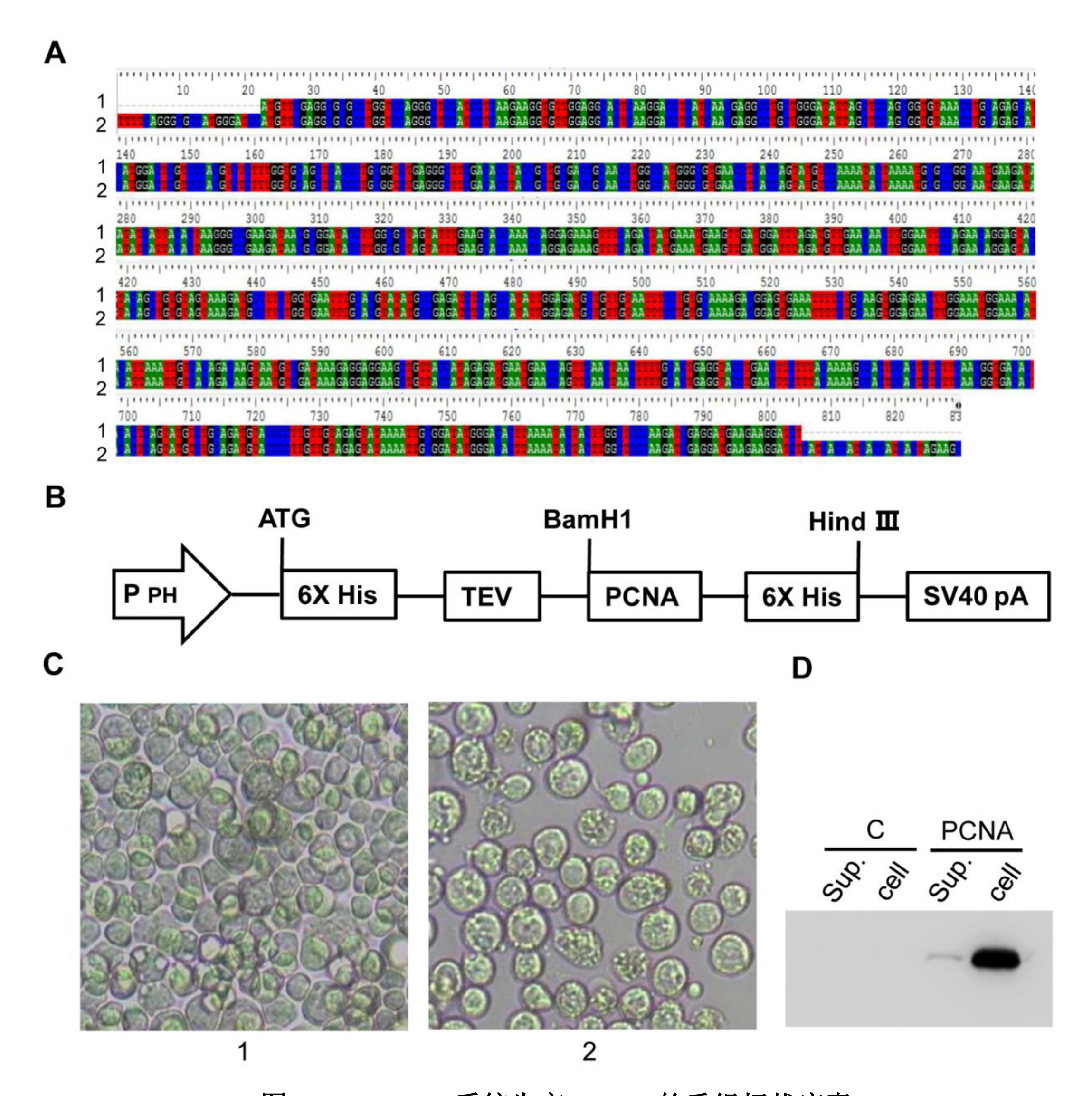


图 1 Bac-to-Bac 系统生产 PCNA 的重组杆状病毒

Fig. 1 Generation of recombinant baculovirus for expressing PCNA by Bac-to-Bac system

(A) Sequence alignment of the sub-cloned gene of PCNA with the theoretical sequence from GenBank. 1: theoretical sequence, 2: tested sequence. (B) The expression cassette was applied for producing rPCNA protein. (C) Sf9 insect cells were infected with buffer (mock, C1) or P3 baculovirus (C2). (D) Three days post infection, protein PCNA was tested by western blot with anti-His antibody in cell-only control and infected cells.

2.2 MOI 和感染时间对蛋白表达的影响

为提高 PCNA 蛋白产量，实验中优化了 MOI 和感染时间。由于 rPCNA 蛋白不能分泌到培养基中，所以只对细胞沉淀中的蛋白做 western blot 检测，以确定不同条件下 rPCNA 表达量的高低。低 MOI（0.05）感染 144 小时或者高 MOI（10）感染 48 小时，Sf9 细胞蛋白产量很高（图 2）。然而，高 MOI 条件下，rPCNA 蛋白产量随感染时间延长急剧降低。一般认为，高 MOI 会严重损害昆虫细胞的活力，导致重组蛋白产量低，这是由于（1）细胞生长时间短，密度低；（2）受损细胞释放大量的蛋白酶，而蛋白酶通常拥有明显的降解重组产物的倾向[8]。因此，较低的 MOI（0.05）、较长的感染时间

（144h）选定为 rPCNA 表达的最优参数。

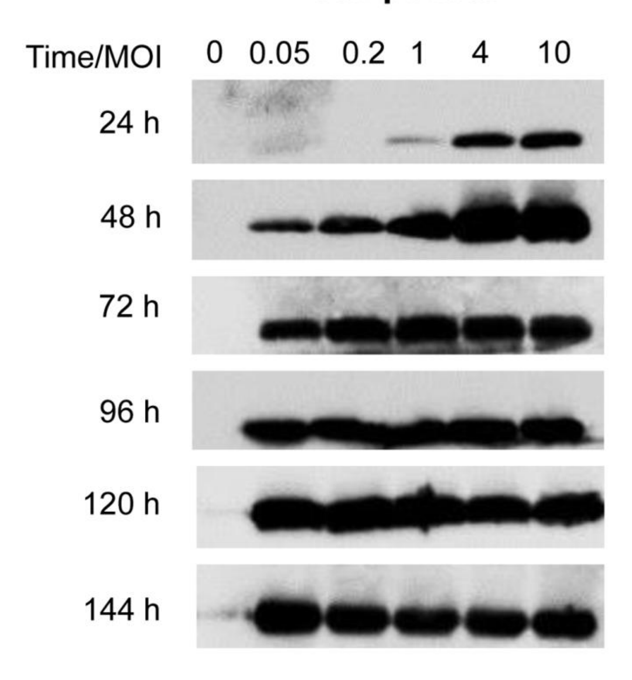


图 2 MOI 和侵染时间对 rPCNA 蛋白表达量的影响

Fig. 2 Effect of MOI and infection time on expression of rPCNA

Sf9 cells in 6-well plates were infected with P3 baculovirus at different MOI values (0,0.05, 0.2, 1, 4, 10) for different periods (24, 48, 72, 96, 120, 144 h). Cell pellets were tested by western blot with anti-His antibody.

2.3 小规模表达和纯化 rPCNA 蛋白

基于最优的 MOI 和感染时间，小规模表达和纯化 rPCNA 蛋白。Sf9 细胞裂解液（50ml）流过 Ni-NTA 柱，结合缓冲液（20 mM 咪唑）洗涤柱子，咪唑浓度梯度（50, 100, 200, 500 mM）洗脱 rPCNA。200 mM 和 500 mM 咪唑的洗脱液中有高纯度的 rPCNA（图 3A）。收集该部分洗脱液超滤浓缩，SDS-PAGE 和 Western blot 分析。与标准 PCNA 蛋白（P1, 36kDa）相比，重组 PCNA（P2）约为 37kDa（图 3B）。多出的 1kDa 是 rPCNA 蛋白中一个 His-tag 和一个 TEV 识别位点的大小。anti-PCNA 的特异性抗体也检测到了 37kDa 的条带（图 3C）。因此，rPCNA 可以小规模生产和纯化。

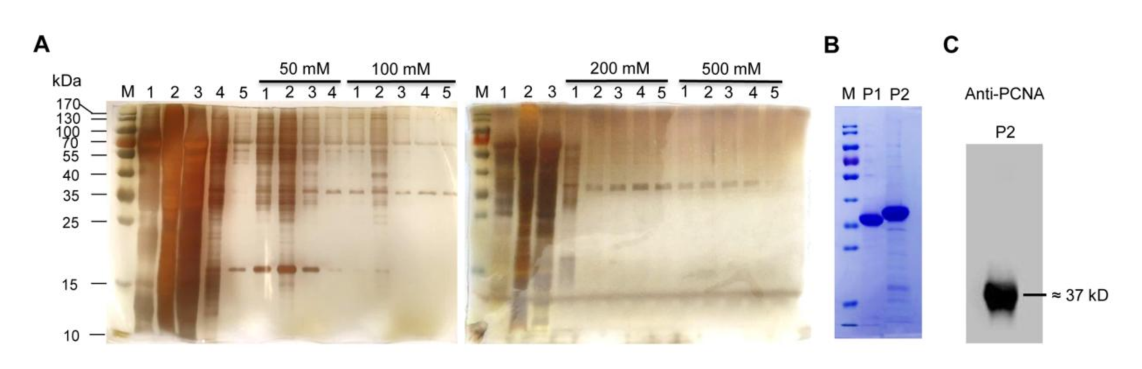


图 3　小规模表达及纯化 rPCNA 蛋白

Fig. 3 Small-scale expression and purification of rPCNA by Ni-NTA chromatograph

(A) Proteins hanging on the column were eluted by imidazole gradient (50, 100, 200, 500 mM) and tested by silver staining assay. (B)Aliquots eluted from 200 and 500 mM imidazole were concentrated and analyzed by SDS-PAGE gel stained with coomassie brilliant blue staining and western blot with anti-PCNA antibody(C). Lane M: standard protein marker; lane 1, 2: the extracellular medium and the cell pellets of cell-only, respectively; lane 3: the cell lysate of infected cells; lane 4: flow-through; lane 5: effluent of 20 mM imidazole; lane P1: standard protein of PCNA (from Diarect Company); lane P2: rPCNA purified by Ni-NTA column.

2.4 大规模表达和纯化 rPCNA 蛋白

同 2.3，镍柱纯化 rPCNA 蛋白后银染检测（图 4A），将条带单一的洗脱液混合，超滤浓缩，考马斯亮蓝染色检测（图 4B）。重组 PCNA 蛋白纯度超过 90%，产量为 140mg / L 细胞。为了进一步提高 rPCNA 纯度，经预实验比较（数据未显示），选用强阴离子交换色谱（Q Sepharose）进一步纯化。rPCNA 可完全被 400 mM 的氯化钠洗脱（图 4C），经 SDS-PAGE 胶分析，纯度> 95%（图 4D），且能够被 anti-PCNA 一抗特异性识别（图 4E）。我们建立了 5L 细胞培养规模的 rPCNA 蛋白生产和纯化方法，产量高达 110 mg/L，纯度大于 95%。作为比较，酵母 PCNA 基因在大肠杆菌中表达仅为 60 mg/L [10]，而人 PCNA 基因在大肠杆菌中产量则更低，只有 10 mg/L [17]。因此，Sf9 细胞更适合生产人的 PCNA 蛋白。

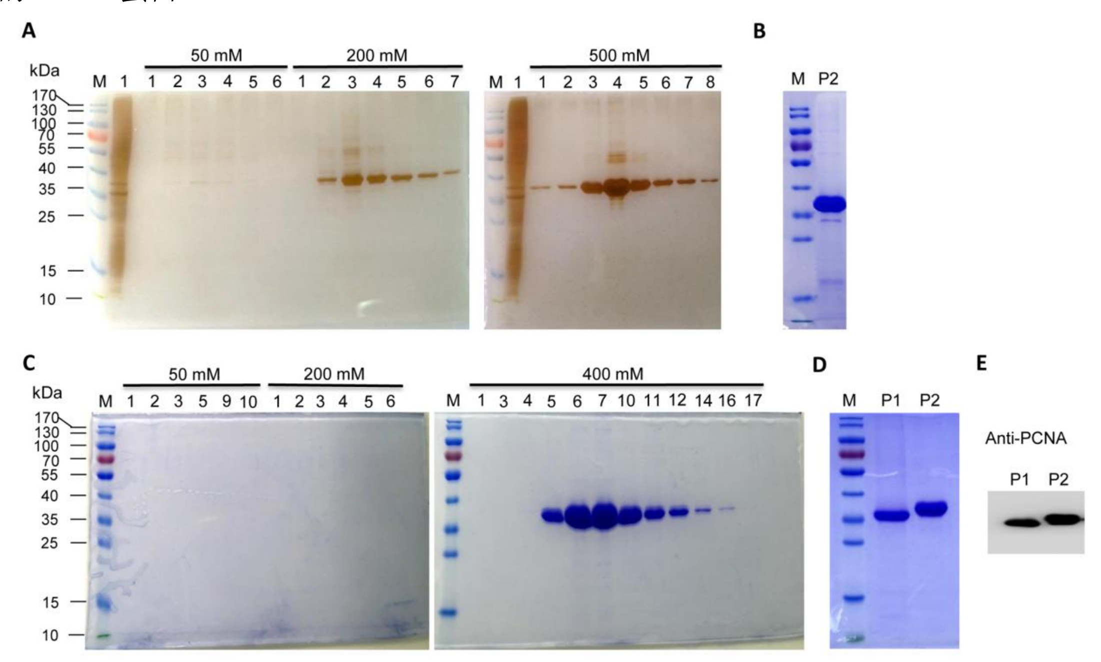


图 4 大规模表达和纯化 rPCNA 蛋白

Fig. 4 Large-scale expression and purification of rPCNA

(A, B) Cell lysate was purified by Ni-NTA chromatograph. (C, D, E) The clean fractions of Ni-NTA chromatograph were further purified by ion exchange column (Q sepharose). All rPCNA was eluted by 400 mM sodium chloride (C) and transferd to preservation solution (P2), additionally detected by coomassie blue staining (D) and western blot (E). Lane M: standard protein marker; lane 1: cell pellets of cell-only; lane P1: standard protein of PCNA; P2: purified protein of rPCNA.

2.5 rPCNA 的抗体结合特异性检测

为评估 rPCNA 的抗体结合特性，间接 ELISA，一种常规的抗原抗体结合检测方法[18-20]，被引用到了评价体系中。检测了来自医院的 15 个阳性和 20 个阴性人 SLE 血清样品（表 1）。根据 ELISA 阴性血清检测结果，PCNA1 和 rPCNA 的截止值（cut-off value）分别为 0.208 和 0.196（图 5）。重组 rPCNA 的抗体结合特性显著高于大肠杆菌表达的 PCNA1，分别为 93.3％和 73.3％。与大肠杆菌相比，昆虫细胞更适宜于表达 PCNA 蛋白。ELISA 数据表明，rPCNA 具有良好的抗体结合特性，可用于 PCNA 相关疾病的体外诊断。

表 1 ELISA 检测 rPCNA 的抗体结合特性

Table 1　ELISA detecting the binding specificity to antibodies of rPCNA

	PCNA1		rPCNA	
	P	N	P	N
Positive	11	16	14	17
Negative	4	4	1	3
Total	15	20	15	20
Sensitivity (%)	73.3 (11/15)		93.3 (14/15)	
Specificity (%)		80.0 (16/20)		85.0 (17/20)

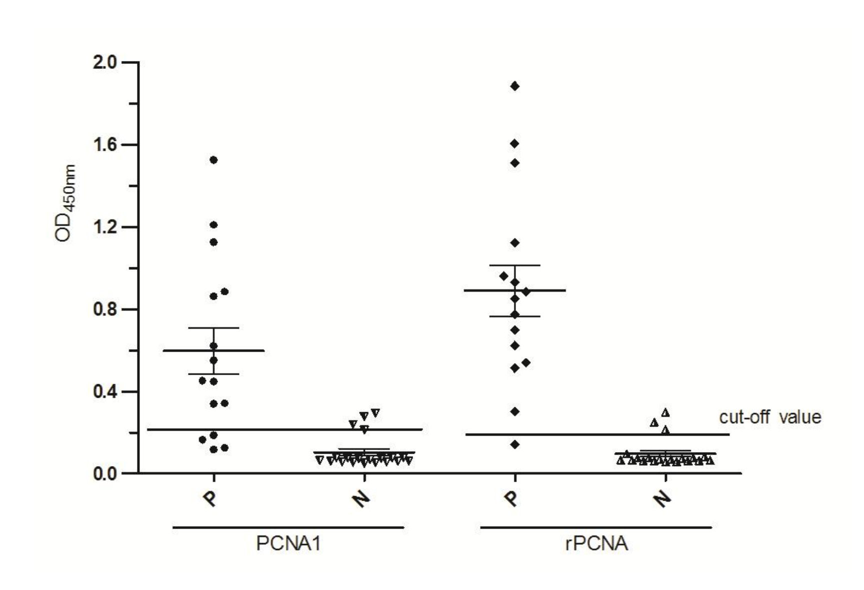


图 5 间接 ELISA 检测 rPCNA 的抗体结合特异性

Fig. 5 Binding specificity test of recombinant PCNA by indirect ELISA.

P: positive serum of SLE; N: negative serum of SLE; PCNA1: PCNA product expressed by *E. Coli* (from Diarect Company); rPCNA: recombinant PCNA.

3. 讨论

1983 年，人干扰素-β 蛋白利用重组杆状病毒在昆虫细胞中实现了表达[21]，这是杆状病毒表达系统（BEVS）表达外源蛋白首次报道。经过了三十多年的发展[22,23]，该系统已成为研究与生产不同物种来源的活性蛋白有效而常用的工具。与大肠杆菌系统相比，BEVS 具有同哺乳动物细胞类似的翻译后加工修饰，它表达的重组蛋白的结构与天

然蛋白更为接近。此外，该系统和哺乳动物细胞表达系统相比，操作技术更加简单，成本也更低。经过几十年的训化，很多常用的昆虫细胞已经完全适应了悬浮培养，悬浮发酵规模容易放大，便于工业化规模的蛋白生产。

实验采用两步纯化的方式得到了高纯度的 PCNA 蛋白，产量高达 110 mg/L。与大肠杆菌生产的 PCNA 相比，rPCNA 同抗体结合的能力更强，能高效识别 SLE 病人血清的抗体，因此昆虫细胞是更适合生产人源 PCNA 蛋白的宿主。本研究首次建立了 Sf9 细胞重组表达人 PCNA 蛋白的工艺流程和纯化策略，高纯度的 rPCNA 蛋白在开发为体外诊断试剂盒方面具有潜在的应用价值，并可能显着降低未来 PCNA 相关疾病的诊断成本。

参考文献

[1] Moldovan G L, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 2007, 129(4): 665-679.

[2] Miyachi K, Fritzler M J, Tan E M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immuno*, 1978, 121(6): 2228-2234.

[3] Sherer Y, Gorstein A, Fritzler M J, et al. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheu*, 2004, 34(2): 501-537.

[4] van Oers M M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol*, 2011, 107(Suppl): 3-15.

[5] Liu L, Zhong S, Yang R Z, et al. Expression, purification, and initial characterization of human alanine aminotransferase (ALT) isoenzyme 1 and 2 in High-five insect cells. *Protein Expres Purif*, 2008, 60(2): 225-231.

[6] Shay B, Gruenbaum-Cohen Y, Tucker A S, et al. High yield expression of biologically active recombinant full length human tuftelin protein in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr Purif*, 2009, 68(1): 90-98.

[7] Wilde M, Klausberger M, Palmberger D, et al. Tnao38, high five and Sf9--evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4): 743-749.

[8]Grennan J F, Wolstenholme A, Fowler S, et al. High-level expression of recombinant immunoreactive thyroid peroxidase in the High Five insect cell line. *J Mol Endocrinol*, 1996, 17(2): 165-174.

[9] Roggenbuck D, Reinhold D, Wex T, et al. Autoantibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, are new markers in Crohn's disease. *Clin. Chim. Acta.*, 2011, 412(9-10): 718-724.

[10] Biswas E E, Chen P H, Biswas S B. Overexpression and rapid purification of biologically active yeast proliferating cell nuclear antigen. *Protein Expr Purif*, 1995, 6(6): 763-770.

[11] Byrne-Steele M L, Hughes R C, Ng J D. Recombinant production, crystallization and preliminary X-ray analysis of PCNA from the psychrophilic archaeon Methanococcoides burtonii DSM 6242. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2009, 65(11): 1131-1135.

[12] Bauer G A, Burgers P M. Molecular cloning, structure and expression of the yeast proliferating cell nuclear antigen gene. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(2): 261-265.

[13] Naneh O, Zavec A B, Pahovnik D. An optimized protocol for expression and purification of murine perforin in insect cells. *J Immunol Methods*, 2015(1), 426: 19-28.
[14] Bao H, Yu T, Jin Y, et al. Purification of HRSV F protein from a eukaryotic expression vector and establishment of a sandwich ELISA method. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 111-114.
[15] Zheng Y, He R, He M, et al. Characterization of *Sarcoptes scabiei* cofilin gene and assessment of recombinant cofilin protein as an antigen in indirect-ELISA for diagnosis. *BMC Infect Dis*, 2016, 16(1): 16-21.
[16] Zhao Y, Ma T, Ju X, et al. Expression of E2 gene of bovine viral diarrhea virus in *Pichia pastoris*: a candidate antigen for indirect Dot ELISA. *J Virol Methods*, 2015, 212(1): 17-22.
[17] Zhang P, Zhang S J, Zhang Z J, et al. Expression and physicochemical characterization of human proliferating cell nuclear antigen. *Biochemistry*, 1995, 34(34): 10703-10712.
[18] Haubruck H, Mauch L, Cook N J, et al. Expression of recombinant human thyroid peroxidase by the baculovirus system and its use in ELISA screening for diagnosis of autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*, 1993, 15(4): 275-284.
[19] Pavlidis P, Shums Z, Koutsoumpas A L, et al. Diagnostic and clinical significance of Crohn's disease-specific anti-MZGP2 pancreatic antibodies by a novel ELISA. *Clin Chim Acta*, 2015, 441(1): 176-181.
[20] Mitchell M C, Tzelos T, Handel I, et al. Development of a recombinant protein-based ELISA for diagnosis of larval cyathostomin infection. *Parasitology*, 2016, 143(8): 1055-1066.
[21] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol Cell Biol， 1983, 3(12): 2156-2165.
[22] van Oers M M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. J Invertebr Pathol， 2011, 107(Suppl): 3-15.
[23] Li S F, Wang H L, Hu Z H, et al. Genetic modification of baculovirus expression vectors. Virol Sin, 2012, 27(2): 71-82.

Expression and Purification of Proliferating Cell Nuclear Antigen in *Spodoptera Frugiperda* Cells

CHEN Jun-jun[1]· LOU Ying[1] ZHANG Yuan-xing[1,2,3] ·LIU Qin[1,2,3] ·LIU Xiao-hong[1,2]

[1] State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
[2] Shanghai Engineering Research Centers of Maricultured Animal Vaccines, Shanghai 200237, China
[3] Shanghai Collaborative Innovation Center for Biomanufacturing, Shanghai, 200237, China.

Abstract Objetive: The object is to produce recombinant human proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein using insect cell expression system and purify and identify its

antibody binding characterization. Methods: Human PCNA gene was amplified from HeLa cells and cloned into the baculovirus vector AcMNPV. Using insect cells, the recombinant baculovirus containing the PCNA gene was obtained. The virus infected the cells to express the protein, which was reached high purity by combining the nickel column affinity chromatography and the ion exchange chromatography. ELISA method was set to identify its binding activity. Results：Full length recombinant human PCNA (rPCNA) was produced in a baculovirus expression system. The optimal multiplicity of infection (MOI) value and infected time were 0.05 and 144 h respectively. The produced protein samples were subsequently purified by a two-step procedure, including Ni-NTA affinity chromatography and ion exchange chromatography. The yield of rPCNA was up to 110 mg/L cell culture, with a purity > 95% by SDS-PAGE. Indirect ELISA results showed that antibody binding activity of rPCNA was much higher than that of PCNA expressed by *E. Coli* and rPCNA took a sensitivity and specificity of 93.3% and 85.0%, respectively. Conclusions： This work established an expression and purification procedure for rPCNA and the produced rPCNA presented high antibody binding characterization which would have great potential applications on diagnosis of PCNA-associated diseases *in vitro.*

Keywords Proliferating cell nuclear antigen, Baculovirus, Insect cells, Protein purification， Antibody binding characterization